

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K15167

研究課題名（和文）脳組織タンパク質の質量分析イメージングの高感度化に向けた技術開発

研究課題名（英文）Improvement of sensitivity for mass spectrometry imaging of proteins in brain tissues

研究代表者

川岸 将彦（KAWAGISHI, Masahiko）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60323606

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：質量分析イメージング(MSイメージング)とは、組織切片上で直接に質量分析を行うことで、生体分子や投与薬剤を直接検出し、生体組織上における目的化合物の分布を画像として表示する技術である。脳組織のMSイメージングにおいて、脂質の分布情報は得られているが、タンパク質の解析は進んでいない。この研究は、MSイメージングにおけるタンパク質の検出の効率を上げて、より多くのタンパク質の局在情報を得るための技術開発が目的である。組織切片上のタンパク質を、位置・形態を保ったままブロットング膜に転写し、それを質量分析で同定する手法の改善を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年では、組織に存在する分子を網羅的に同定解析する手法が開発され、それによって多くの新しい知見が得られてきているが、その中でも、タンパクの局在情報を網羅的に同定する方法は遅れている。この研究は、このタンパクの局在情報を網羅的な同定を可能にするための、技術開発が目的である。タンパク質の膜転写における位置・形態の保持を改善した事は、組織切片のタンパク質の局在情報を保持したままMSイメージングする上で、役に立つものであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Mass spectrometry imaging (MSI) is a method to visualize the spatial distribution of target compounds by performing mass spectrometry measurements directly on the specimens. MSI of brain tissues has been used widely to the analyses of lipids and metabolites, but its application to proteins has been so far limited. This was partly because protein species that are expressed in small amount could not be detect with good sensitivity. This study was aimed at improving the sensitivity to detect protein species in MSI so that this method could be applied to proteins with lower amount of expression. We mainly focused on the "molecular scanner" approach in which proteins in tissues sections were transferred to blotting membranes while keeping their initial locations before performing MSI detection of the membranes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：質量分析 顕微鏡技術 脳・神経 細胞・組織 蛋白質

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

MS イメージングとは、組織切片上で直接に質量分析を行うことで、生体分子や投与薬剤を直接検出し、生体組織上における目的化合物の分布を画像として表示する新しい技術である。試料をすりつぶさずに組織の形態を保ったままで、質量分析・タンデム質量分析による分子の同定を行い、それによって分子の分布情報を描画するものである。そこから微小領域の形態/特性解明、マーカー探索、動態解析をすることを狙っている。従来は、特定の分子に対する抗体を分子ごとに用意し、免疫組織染色を行うことによって得られた知見が、一挙に取得できる可能性のある手法である。

しかし、現状の MS イメージングの主たるターゲットは脂質分析であり、タンパク質の局在・同定については実用化に至っていない。質量分析では存在量の多いタンパク質・ペプチドが優先的にイオン化されてしまうため、組織中に多量あるタンパク質の内、大量に存在する限られた種類のタンパク質しか同定することができないからである。精製されたタンパク質・ペプチドに対する質量分析の検出感度は非常に高いが、混合物中に多量のペプチドが存在すると、微量なペプチドはたとえ検出限界を越えた量であっても検出できない。混合物から少量の単一ペプチドを分離するのは容易ではなく、測定範囲のダイナミックレンジは狭く(10 の 4 乗程度)になってしまうという問題があった。

### 2. 研究の目的

この研究課題では、多量に検出されるペプチド画分を分離して、組織切片上における位置関係を保持したまま、微量成分を検出することをめざす。具体的には、モレキュラースキャナー法(組織切片から膜に転写し、その上で質量分析を行うもの。T. C. Rohner et al. *Mechanisms of Ageing and Development* 126 (2005) 177-185.)を応用、改良する。

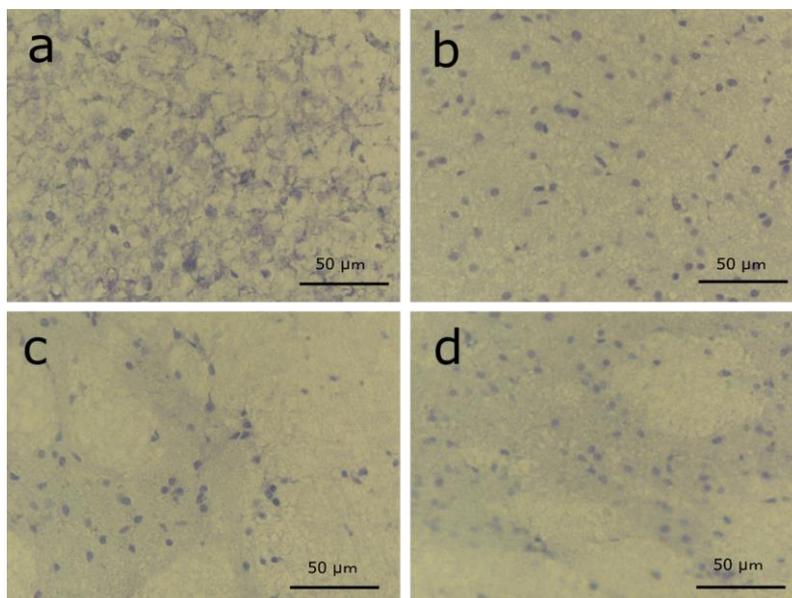
### 3. 研究の方法

#### (1) 脳切片試料の作製

マウス(Slc:ICR 7 週齢 雄)を、ヘパリン添加リンゲル液で灌流した後、灌流固定法と、新鮮凍結切片作成後固定法との二通りの処理を行った。灌流固定法では、リンゲル液に引き続いて、各固定液 (4% PFA, 0.1% DSP (同仁), 0.1% DSP (Sigma), 0.1% DTBP)を用いて灌流固定を行った。その後、脳を取り出し、スクロース溶液置換をしてから、凍結切片の作製を行った。一方、新鮮凍結切片作成後固定法では、固定液は流さずに、そのまま凍結切片の作製を行い、その後に切片の固定を行った。後固定には、灌流に用いた固定液の他に、MALDI において脂質を除去して収量を上げるとの報告がある isopropanol (Seeley EH et al. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2008;19(8):1069 - 1077.)も用いた。

図 1. 固定法による組織の形態保持状態の比較。

(a) PFA 固定、(b) DTBP 固定、(c) DSP 固定 (同仁)、(d) DSP 固定 (Sigma). DSP は、製品により溶解度に差が見られたので二つの製品を比較したが、特に目立つ差は見られなかった。



#### (2) 組織切片の蛋白のブロットティング膜への転写

切片を採取したスライドガラス上に 5% acrylamide 流して重合させて、組織切片をゲルに移し、そこから蛋白を PVDF 膜に転写した。転写の方式は、押し付け法、従来型のセミドライトランスファー装置 (BIO CRAFT) と、高速転写装置 (XV PANTERA SYSTEM, DRC)を用いた。転写効率の評価は、Direct Blue 71 染色で行った。

#### (3) ブロットティング膜

からの質量分析

島津製作所の協力で、ブロットニング膜上の試料をトリプシン溶液で処理した後に、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 AXIMA Confidence で質量分析を行い、ピークとして表れる蛋白断片のペプチドの出る数と信号強度を調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 固定剤による組織の形態保持状態の評価

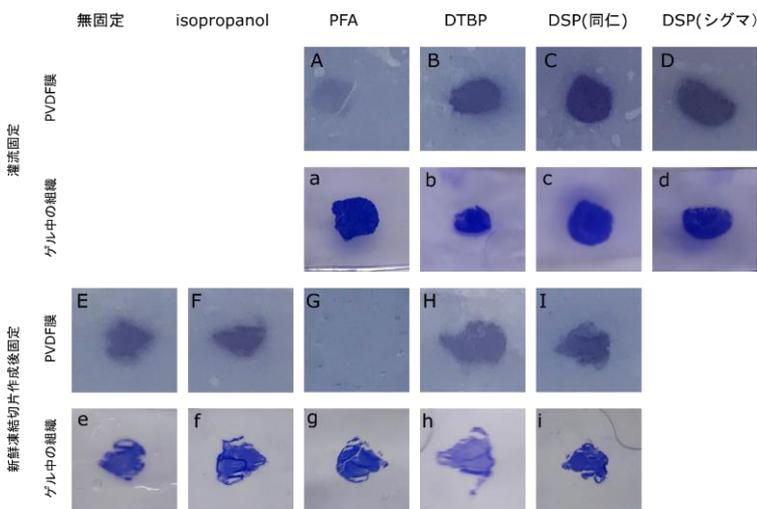
通常の光学顕微鏡での形態観察では PFA による固定処理を行うが、PFA は蛋白分子同士を強固に架橋するため、形態保持には良いが、質量分析で蛋白を分離するには不利である可能性があった。そこで、PFA よりも緩い架橋剤として DSP による固定法を試みた。また DSP は水への溶解度が低いので、似た架橋剤で溶解度の高い DTBP も試した。以上の固定剤で固定した組織の像を図 1 に示す。微細な形態の保存は PFA よりは劣るが、数 $\sim$ 10  $\mu$ m 程度以上の構造を観察する上では問題がないと考えられた。

##### (2) 各固定法による膜転写効率や組織の形態保持状態の評価

モレキュラスキャナー法では、組織切片のタンパク質を膜に転写して、そこから質量分析を行うが、これは、組織を構成する成分の混合物の中から一定の成分を分画する操作である。この際には転写の効率の高さと、転写の際の滲みによる位置情報の乱れの課題があった。転写の方法として、押し付け法など幾つかの方法を試行錯誤したのち、組織切片をポリアクリルアミドゲルに包埋してから電氣的に膜に転写する方法で、転写の効率を改善できる事が分かった。特に、高速転写装置を用いると、転写の際の滲みによる位置情報の劣化を少なく抑えられる事が分かった。この高速転写の条件下で、組織の固定法（灌流固定法、新鮮凍結切片作成後固定法）、固定剤（PFA, DTBP, DSP など）が、膜転写効率や組織の形態保持に影響するかを調べた。結果を図 2 に示す。灌流固定では(図 2 A・D, a

-d)、PFA が最も薄く、DSP が最も濃い。crosslinker を用いた固定の方が PFA 固定よりも転写効率高かった。新鮮凍結切片作成後固定法では(図 2 E・I, e・i)、無固定では転写された組織の輪郭が不明瞭だった一方、PFA では殆んど転写されなかった。灌流固定と同様に、crosslinker を用いた固定の方が転写効率高く、形態保持も良かった。DSP と DTBP との crosslinker を用いた固定同士で比べると、新鮮凍結切片作成後固定法よりも灌流固定の方が染色が濃かった。新鮮凍結切片作成後固定法では、薄い切片に直接的に固定しているため、固定が強かったと考えられる。以上、タンパク質固定が強すぎると、転写効率が低くなる傾向があった。一方、固定をしないと、タンパク質が漏れて広がり、正確な位置情報が得られない。今回の研究で比べた条件の中では、クロスリンカーの灌流固定が有用であった。

図 2. 各固定法や固定剤による膜転写効率や組織の形態保持への影響の比較。大脳前額断の切片 (大きさ約 5 × 7 mm) から、PVDF 膜に転写し、PVDF 膜に転写されたタンパク質 (A-I) と gel 中に残った組織(a-i)を染色し、染色の濃淡で転写効率を比較した。組織の固定法は、灌流固定 (A-D, a-d) と、新鮮凍結切片作成後固定法 (E-I, e-i)。固定剤は、PFA (A, a, G, g), DTBP (B, b, H, h), DSP (C, D, c, d, I, i) の他、新鮮凍結切片作成後固定法では無固定 (E, e) と、脂質の除去のための isopropanol 洗滌 (F, f) を比較している。



た条件の中では、クロスリンカーの灌流固定が有用であった。

### (3) 新鮮凍結切片作成後固定法での質量分析の検討

上の、転写後の膜の染色から、各固定法がタンパク質の膜への転写効率に与える影響が評価出来た。更にそこから質量分析を行って、タンパク質断片のペプチドのピークの数や強度に各固定法が与える影響を調べた。結果の一例を図3(a)に示す。ペプチドのピークの信号強度と数は、固定無し(isoPrOH洗浄あり)のものでは、 $1000 < m/z$  の大きなピークが増えていた。これは、isoPrOH 洗浄による脂質の除去の効果だと考えられる。次いで DSP 固定のものでペプチドのピークの信号が多かったが、PFA と DTBP 固定の例では、ピーク数が少なく、特に  $1000 < m/z$  の大きなピークが大きく減っていた。図3(b)では、プロッティング膜の染色に使用した Direct Blue 71 染色が質量分析に与える影響を調べた例である。色素分子がタンパク質に結合して、イオン化に影響する可能性も考えられたが、実際の結果では悪影響は全くなく、染色した試料の方で、多くのペプチドのイオンのピークが見られた。染色液に少量含まれる有機溶媒による脂質除去の効果もあるのかもしれない。染色した試料の方が、転写した組織の部位の確認がしやすいので、これは実験に都合の良い結果であった。

### (4) 灌流固定法での質量分析の検討

同様に、灌流固定した試料でも、タンパク質断片のペプチドのピークの数や強度に各固定法が与える影響を調べた。結果を図4に示す。PFA 固定と DSP 固定ともに、同程度に多数のピークが見られた。Direct Blue 71 による染色の濃淡では、DSP 固定で濃く、PFA 固定では薄かったので、ピークの出方にも差が出ると予想されたが、それほど差は出なかった。PFA によるタンパク質の保存の良さの効果があるのかもしれない。この例では、DSP 固定の架橋を固定後に切る還元剤の DTT も加えてみているが、ペプチドのピークの強度にあまり効果は見られなかった。

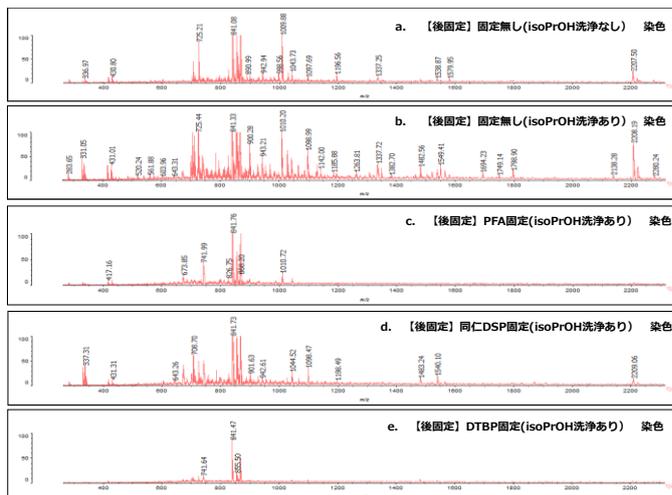
### 5. まとめと今後の課題

以上、組織切片から膜に転写し、その上で質量分析を行うモレキュラースキャナー法の改良のための研究を行った。このモレキュラースキャナー法では、タンパク質の膜転写の効率と、転写の

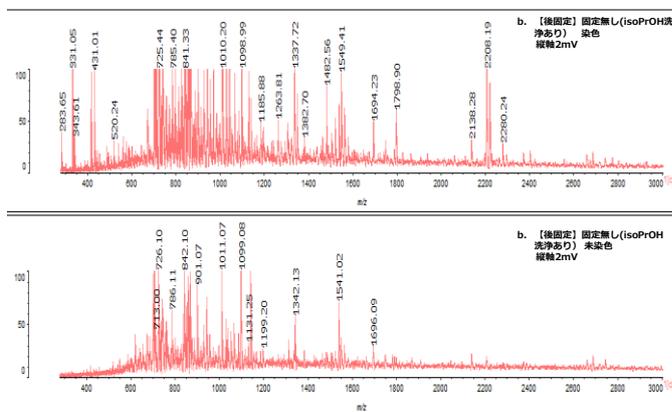
図 3. 新鮮凍結切片作成後固定法で固定した切片から転写した膜での質量分析の比較。

(a) 5通りの固定剤が質量分析に与える影響を比較した例。固定剤は上から、無し、isopropanol 洗浄のみ、PFA, DSP, DTBP の順である。(b) プロッティング膜の Direct Blue 71 による染色の、質量分析への影響。上が染色有り、下が染色無し。

(a)



(b)



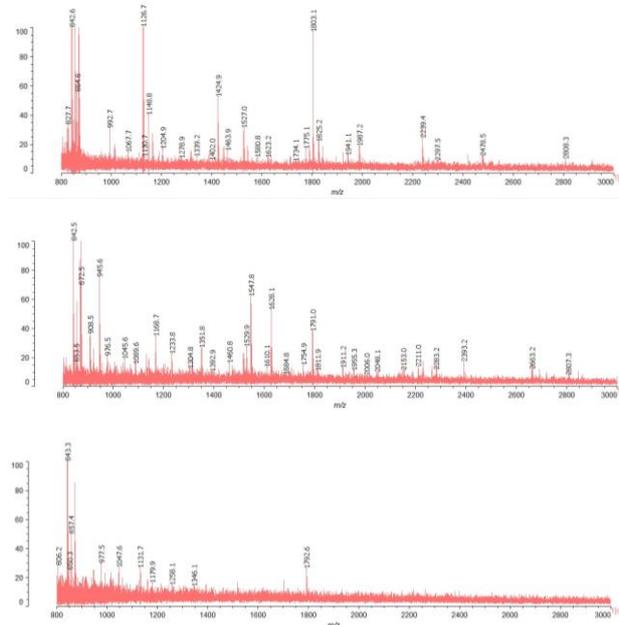
際の位置情報の保持が課題であった。転写の方法としては、組織切片をポリアクリルアミドゲルに包埋してから電氣的に膜に高速転写する方法が有用であった。更に滲みを減らして位置情報を保持するには、組織を包埋前に固定する必要があった。灌流固定と新鮮凍結切片作成後固定法とを試み、両方とも位置情報の保持には有用ではあったが、特に新鮮凍結切片作成後固定法では、PFAのように強い固定剤を使うと、タンパク質の膜転写効率や質量分析のピークの強度が大きく低下してしまう欠点があった。その場合、DSPのようにPFAよりも緩い架橋剤を組織の固定に使用するのは、位置情報と転写効率を両立させるのに使用できた。

PVDF膜に転写された組織のタンパク質を質量分析で同定を試みる場合、膜

の表面の性状が、ピークの数や信号強度に影響を与えている。疎水性が強くペプチドと膜の結合が強いと、膜転写では有利でもペプチドがイオン化しにくく、ピークが出難い。また、trypsin消化液と、プロットイングに使用したPVDF膜との親和性にも影響し、液をはじきやすい場合は、消化効率が悪くなり、ペプチドのピークが読み難いこともある。更に、組織より持ち込まれる脂質も、膜の表面の性状に影響を与えていた。この膜の表面の性状を改善して、ペプチドのピークの数と強度を改善するのが、今後の課題として残っている。

図 4. 灌流固定法で固定した切片から転写した膜での質量分析の比較。

使用した固定剤は上から、PFA, DSP, DSP + DTT.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	寺田 純雄  (TERADA Sumio)  (00262022)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授   (12602)	
研究分担者	齊藤 健太  (Saito Kenta)  (60374659)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教   (12602)	
研究分担者	佐藤 啓介  (Sato Keisuke)  (60644044)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教   (12602)	